

1/19/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009887533

WPI Acc No: 1994-167448/199420

XRAM Acc No: C94-076782

Use of peroxide to degrade nucleic acid - partic. in the processing of cells to reduce viscosity in the isolation of polyhydroxyalkanoate polymers

Patent Assignee: ZENECA LTD (ZENEC ); MONSANTO CO (MONS )

Inventor: GREER W

Number of Countries: 047 Number of Patents: 011

Patent Family:

Patent No	Kind	Date.	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9410289	A1	19940511	WO 93GB2208	A	19931027	199420 B
AU 9462801	A	19940524	WO 93GB2208	A	19931027	199434
			AU 9462801	A	19931027	
FI 9501997	A	19950426	WO 93GB2208	A	19931027	199529
			FI 951997	A	19950426	
NO 9501595	A	19950426	WO 93GB2208	A	19931027	199530
			NO 951595	A	19950426	
EP 669970	A1	19950906	EP 93923624	A	19931027	199540
			WO 93GB2208	A	19931027	
JP 8502415	W	19960319	WO 93GB2208	A	19931027	199644
			JP 94510819	A	19931027	
AU 676026	B	19970227	AU 9462801	A	19931027	199717
US 5627276	A	19970506	WO 93GB2208	A	19931027	199724
			US 95424458	A	19950427	
BR 9307321	A	19990601	BR 937321	A	19931027	199927
			WO 93GB2208	A	19931027	
EP 669970	B1	20000308	EP 93923624	A	19931027	200017
			WO 93GB2208	A	19931027	
DE 69328033	E	20000413	DE 628033	A	19931027	200025
			EP 93923624	A	19931027	
			WO 93GB2208	A	19931027	

Priority Applications (No Type Date): GB 9222561 A 19921027

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; EP 145233; WO 8903226

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9410289 A1 E 13 C12N-001/08

Designated States (National): AT AU BB BG BR BY CA CH CZ DE DK ES FI GB HU JP KP KR KZ LK LU LV MG MN MW NL NO NZ PL PT RO RU SD SE SK UA US UZ VN

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL OA PT SE

EP 669970 B1 E C12N-001/08 Based on patent WO 9410289

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL SE

DE 69328033 E C12N-001/08 Based on patent EP 669970

Based on patent WO 9410289

AU 9462801 A C12N-001/08 Based on patent WO 9410289

EP 669970 A1 E C12N-001/08 Based on patent WO 9410289

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

JP 8502415 W 20 C12P-007/62 Based on patent WO 9410289

AU 676026 B C12N-001/06 Previous Publ. patent AU 9462801

US 5627276	A	4 C07H-001/00	Based on patent WO 9410289
BR 9307321	A	C12N-001/08	Based on patent WO 9410289
FI 9501997	A	C12N-000/00	Based on patent WO 9410289
NO 9501595	A	C12N-001/08	

Abstract (Basic): WO 9410289 A

Recovering a prod. from an aq. prepn. comprising a quantity of nucleic acid (NA) sufficient to lead to a viscosity high enough to cause difficulty in a processing stage, the improvement comprises degrading the NA by contacting it with a peroxide before or during the stage.

Also claimed are: (A) a process of degrading NA in a soln. which comprises at least 0.1 g/l, e.g. 0.5-20 g/l of NA dissolved in water, by contacting it with a peroxide; (B) a process which comprises controlling the viscosity of an aq. prepn. which contains solid particles and at least 0.1 g/l, e.g. 0.5-10 g/l of NA, which comprises degrading NA with a peroxide and sepg. solid particles; (C) a process of receiving a polyhydroxyalkanoate (PHA) or polysaccharide polymer from cells; and (D) the use of peroxide as a NA degrading agent.

Pref. the peroxide is supplied as H2O2. The PHA polymer may be a polyhydroxybutyrate/valerate polymer.

USE/ADVANTAGE - The method is used partic. for the extn. of biopolymers such as PHA polymers from cells. The peroxide can degrade NA and reduce the viscosity of NA-contg. solns. efficiently at low temps..

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): US 5627276 A

In a process of recovering a product from an aqueous preparation which comprises a quantity of nucleic acid sufficient to lead to a viscosity high enough to cause difficulty in a processing stage, wherein the improvement is degrading the nucleic acid by contacting it at a temperature in the range of 15 deg. to 35 deg. C. with a peroxide before or during the said stage, the peroxide being used in sufficient amount to degrade the nucleic acid and reduce the viscosity of said aqueous preparation to facilitate the processing thereof to recover the product therefrom.

Dwg.0/0

Title Terms: PEROXIDE; DEGRADE; NUCLEIC; ACID; PROCESS; CELL; REDUCE; VISCOSITY; ISOLATE; POLY; HYDROXY; ALKANOATE; POLYMER

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07H-001/00; C12N-000/00; C12N-001/06; C12N-001/08; C12P-007/62

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C12N-001/20; C12P-007/62; C12R-001-05

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C02; B04-C03D; D05-H

Chemical Fragment Codes (M1):

\*02\* M423 M720 M903 N132 N422 N512 N513 Q233 V735

\*03\* H4 H405 H484 J0 J014 J1 J171 J2 J273 M280 M311 M312 M313 M314 M315  
M323 M331 M332 M333 M343 M349 M381 M393 M423 M510 M520 M530 M540  
M720 M903 M904 N104 N161 N164 N512 N513 Q233 V743 9420-53001-P

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* C101 C408 C550 C730 C800 C801 C802 C804 C805 C807 M411 M781 M903  
M904 M910 Q233 R01732-U

Derwent Registry Numbers: 1732-U

Specific Compound Numbers: R01732-U

Generic Compound Numbers: 9420-53001-P

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-502415

(43)公表日 平成8年(1996)3月19日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 7/62		7432-4B	
C 1 2 N 1/20	Z	8828-4B	
// (C 1 2 P 7/62			
C 1 2 R 1:05)			
(C 1 2 N 1/20			

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平6-510819
(86) (22)出願日	平成5年(1993)10月27日
(85)翻訳文提出日	平成7年(1995)4月27日
(86)国際出願番号	P C T / G B 9 3 / 0 2 2 0 8
(87)国際公開番号	W O 9 4 / 1 0 2 8 9
(87)国際公開日	平成6年(1994)5月11日
(31)優先権主張番号	9 2 2 2 5 6 1 . 4
(32)優先日	1992年10月27日
(33)優先権主張国	イギリス (GB)

(71)出願人	ゼネカ・リミテッド
	イギリス国 ロンドン ダブリュー1ワイ
	6エルエヌ, スタンホープ ゲート 15
(72)発明者	グリーア, ウィリアム
	イギリス国 クリーヴランド ティーエス
	23 1ディーエヌ, ビリンガム, インベリ
	アル・ロード 64
(74)代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高分子分解

(57)【要約】

高分子分解。特に過酸化水素として供給される過酸化物は有効な核酸分解剤であり、細胞内で産生される物質を細胞（特に細菌の）溶解物から回収するために用いることができる。核酸が高粘度の溶液を形成し、このような溶液がその後の加工を妨害するので、細胞溶解物からの核酸の分解又は除去は重要である。例えばポリヒドロキシブチレート/バレレートのようなポリヒドロキシアルカノエートポリマーをそれらが産生される細菌細胞の溶解物から回収するために特に有用である。

## 【特許請求の範囲】

1. 加工段階において問題を惹起するほど高い粘度を生じるような、充分な量の核酸を含む水性ブレパレーションから生成物を回収する方法において、核酸を前記段階の前及び中に過酸化物と接触させることによる核酸分解工程を含む前記方法。

2. 水中に溶解した、少なくとも0.1 g/l、例えば0.5~20 g/lの核酸を含む溶液中の核酸を過酸化物と接触させることによって分解する方法。

3. 固体粒子と、少なくとも0.1 g/l、例えば0.5~10 g/lの核酸とを含む水性ブレパレーションの粘度を制御することを含む方法であって、核酸を過酸化物によって分解し、固体粒子を分離することを含む前記方法。

4. 粘度の低下後にポリヒドロキシアルカノエートをブレパレーションから分離する請求項1~3のいずれかに記載の方法。

5. ブレパレーションが580/秒の剪断速度において10 mPa・sより大きい、例えば50~200 mPa・sの初期粘度を有する請求項1~4のいずれかに記載の方法。

6. 細胞からポリヒドロキシアルカノエート又は多糖ポリマーを回収する方法であって、当該ポリマー以外の細胞物質の分解工程を含み、分解の第1段階において細胞物質を過酸化物によって分解する前記方法。

7. 水性ブレパレーションが細胞溶解物である請求項1~6のいずれかに記載の方法。

8. ブレパレーションが細菌細胞溶解物である請求項7記載の方法。

9. 過酸化物が過酸化水素として供給される請求項1~8のいずれかに記載の方法。

10. 過酸化物の濃度（過酸化水素換算して表現）が0.5~20% w/v、好ましくは0.5~10% w/vである請求項1~9のいずれかに記載の方法。

11. 15~35℃の範囲内の温度において実施される請求項1~10のいずれかに記載の方法。

12. 培地<sup>6</sup>が細胞をアニオン界面活性剤によって溶解することによって調製される請求項1～11のいずれかに記載の方法。

13. アニオン界面活性剤の濃度が0.5～10% w/vである請求項12記載の方法。

14. pHが6～8である請求項1～13のいずれかに記載の方法。

15. ポリヒドロキシアルカノエートポリマーがポリヒドロキシブチレート／バレレートポリマーである請求項4～12のいずれかに記載の方法。

16. 核酸分解剤としての過酸化物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

高分子分解

本発明は核酸の分解に関する。核酸分解は、バイオテクノロジー又は発酵加工に由来する製品を一般的に含む多くのプロセスにおける有用な又は本質的な段階である。

ますます増加する数の重要な製品がしばしば微生物細胞において、産業的プロセスで、細胞内的に生産される。問題の生成物を取り出すために、宿主細胞を分解又は溶解することが一般に必要である。このような溶解に関する問題の1つは、目的生成物と同様に、細胞から分解媒質 (disruption medium) 中に核酸が放出されることである。核酸は、放出されると、溶液中でほどけて、網状組織を形成する；これは細胞溶解物の粘度を上昇させる。この高い粘度は、ごく若干を挙げても、混合、固体／液体分離、ポンピング及び吸着プロセスに不利に影響するので、下流加工段階において問題になりうる。核酸のこの性質のために、細胞分解を含むプロセスは、その後の加工段階を効果的に又は実際に完全に実施するために核酸の分解方法を必要とする。

先行技術では、例えば上記プロセスのような産業的プロセスにおいて核酸を分解する試みが今までになされてきた。1つの可能性は例えばヨーロッパ特許出願第0145233号に開示されるように熱を用いることであり、この出願においては“熱ショック”プロセスが細胞又は細胞溶解物を150℃以上のような高温に短時間（一般には数秒間又は数分間）加熱することを含む。このプロセスは有効ではあるが、かなりエネルギー集約的であり、水性媒質を液体形で100℃よりも有意に高く加熱しなければならない場合には費用のかかる装置の使用を明らかに必要とする。

熱を用いる代わりに、化学的又は生物学的作用剤の添加によって核酸を分解又は除去することができる（例えば沈殿によって）。ヌクレアーゼは、核酸を加水分解し、細胞溶解物にこの目的のために加えることができる酵素である。とはいっても、ヌクレアーゼの精製製剤は高価である。例えばポリエチレンイミンのよう

な沈殿剤はヌクレアーゼよりも有意に安価であり、細胞溶解物の大部分 (bulk) から核酸を効果的に除去することができる。

核酸の化学的分解は細胞溶解物から核酸を除去するために選択すべき経路であるが、有効であり、安価であり、重要なことには、その使用後に不利な残渣を残さない試薬を見い出すことに問題がある。

過酸化物が特に有効で、適切な核酸分解剤として使用可能であることが今回判明し、本発明が取り組むのはこの発見である。この核酸分解がその分子量の実質的な減少を含み、これが核酸の粘度増強性を実質的に減ずると考えられる。本発明の第1態様によると、加工段階において問題を惹起するほど高い粘度を生じるような、十分な量の核酸を含む水性プレパレーション (preparation) から生成物を回収する方法であって、前記段階の前及び中に核酸を過酸化物と接触させることによる核酸分解工程を特徴とする前記方法を提供する。

本発明の第2態様によると、水中に溶解した、少なくとも0.1 g/l (グラム/リットル)、例えば0.5~20 g/lの核酸を含む溶液中の核酸を過酸化物と接触させることによって分解する方法を提供する。

本発明の第3態様によると、固体粒子と、少なくとも0.1 g/l、例えば0.5~10 g/lの核酸とを含む水性プレパレーションの粘度を制御することを含む方法であって、核酸を過酸化物によって分解し、固体粒子を分離することを含む方法を提供する。

本発明の第4態様によると、細胞から多糖又はポリヒドロキシアルカノエートポリマーを細胞から回収する方法であって、前記ポリマー以外の細胞物質の分解を含み、分解の第1段階において細胞物質を過酸化物によって分解する方法を提供する。

核酸は細胞中に見い出される形態の核酸のいずれでもよい。それ故、DNAとRNAの両方の分解が本発明によって考慮される。種々な形態のRNAを扱うことができる (例えば、mRNA、tRNA及びrRNA)。

核酸の水性プレパレーションは溶液であることができる。しかし、生物学的系では、核酸はタンパク質又は他の化学種と充分に結合している。核酸の水性プレ



パレーションが細胞溶解物、特に、例えば細菌細胞溶解物のような微生物細胞溶解物である場合に、本発明は特別な用途を有する。

過酸化物は簡単には過酸化水素であるか、又は過酸化水素の発生源であることができる。この発生源は例えば過酸化物塩であるか又は使用現場で (in situ) 過酸化水素の過酸化物アニオンを発生する他の手段であることができる。過酸化水素は水溶液として入手可能であり、典型的には 3.5 % w/v 水溶液として供給される。本発明に用いる過酸化物の濃度は受容可能な時間内に所望の分解度に達するために充分である任意の濃度である。例えば、濃度（過酸化水素として表現）は 0.1 ~ 20 % w/v の範囲であることができる。通常は、濃度は 0.5 ~ 10 % w/v の範囲内であり、実際には、しばしば 1 ~ 5 % w/v である。

インキュベーション期間の時間と温度は、核酸の分解が受容可能な程度に生ずるように選択される。一般的に述べると、使用温度が高ければ高いほど、インキュベーションに必要な時間は短くなる。温度の上限は問題のバイオ分子を損傷しないという望みと、過酸化水素の有意な量を駆除若しくは分解しないという必要性とによって左右される。温度の下限は、分解反応速度が温度によって低下すると予想することができるので、反応の速度論によって単に支配される。時間に関するかぎり、インキュベーション時間の上限は都合によって決定されるが、下限は核酸の測定可能な量を分解するために充分な長さのインキュベーションを保証する必要性によって決定される。典型的な温度は 5 ~ 100 °C の範囲であり、好ましくは 5 ~ 50 °C であるが、しばしば 15 ~ 35 °C である。室温付近の温度（20 ~ 25 °C）が実際に有用である。典型的な反応時間は、主として温度に依存して、5 分間から 5 日間までの範囲であるが、実際にはしばしば 1 時間から 2 日間までの範囲である。実際には、10 ~ 20 時間のインキュベーション時間が好ましい。実際に有効であると判明している組合せの 1 つは、室温における 16 時間の反応時間である。しかし、より短い反応時間が望ましい場合には、例えば 90 °C までのより高い温度が好ましい。

本発明によって、細胞溶解物中の核酸を分解するために過酸化物を用いる予定である場合には、過酸化物を細胞溶解剤と組合せて用いることができる。適当な

細胞溶解剤は界面活性剤、特に、例えばドデシル硫酸ナトリウム (SDS) のようなアニオン界面活性剤を含む。或いは、細胞を適当な溶解剤で溶解した後に、過酸化物を加えることができる。用いる細胞溶解剤の濃度は当然その性質に依存するが、目安として、SDSは0.1~20%w/v、例えば0.5~20%w/v、典型的に約1~5%w/vの濃度で用いられる。細胞溶解剤を用いない場合には、過酸化物分解を触媒する、存在するタンパク質を変性させるために好ましくは充分な高温に細胞をさらすことが好ましい。この手段によって、プロセスに供給すべき過酸化物量を減ずることができる。

水性環境のpHは特に重要であるとは思われないが、微生物細胞又は他の細胞に由来する水性プレパレーションでは一般にほぼ中性である。本発明は特にpH感受性であるとは思われないので、4~9のpH範囲が実際に適切であると考えられるが、一般にはpHは6~8の範囲内である。

本発明は、上述したように、細胞内で産生される物質の取り出しに特別の用途を有する。細菌細胞又は他の微生物細胞から化合物を取り出すことがしばしば望ましいが、本発明の有用性は高分子の回収に制限されない。本発明は例えばポリヒドロキシブチレート (PHB) 及びポリヒドロキシブチレート/バレレート (PHB/V) コポリマーのようなポリヒドロキシアлкаノエートを含むバイオポリマーの取り出しに特別の用途を有する。ポリヒドロキシアлкаノエートポリマーは、多様な天然の生物又は遺伝子操作 (engineered) 生物、特に細菌又は他の微生物、例えばアルカリジェンス (*Alcaligenes*)、アチオロジウム (*Athiorhodium*)、アゾトバクター (*Azotobacter*)、バチルス (*Bacillus*)、ノーカルディア (*Nocardia*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、リゾビウム (*Rhizobium*) 及びスピリillum (*Spirillum*) 属の微生物において自然に又は誘導によって、産生されることができる。好ましいポリヒドロキシアлкаノエート産生種には、アルカリジェンス オイトロフス (*Alcaligenes eutrophus*)、ハイドロジェノモナス オイトロファ (*Hydrogenomonas eutropha*) H-16、アルカリジェンス ラタス (*Alcaligenes latus*) 及び種々なシュードモナス種がある。ポリヒドロキシアлкаノエートポリマーの産生に関する文献の中の内容豊富な参考文献には、ヨーロッパ特許出願第006

9497号、米国特許第A4101533号、ヨーロッパ特許出願第0144017号、ヨーロッパ特許出願第0145233号及びヨーロッパ特許出願第0392687号がある。

ポリヒドロキシアルカノエートの取り出しにおける核酸分解剤としての例えば過酸化水素のような過酸化物の使用は、核酸分解を例えば約20℃のような比較的低い温度において実施することができるという利益を有し、先行技術の熱ショック方法を凌駕する省エネルギーを表すので、ポリヒドロキシアルカノエートポリマーが低温においてあまり損傷されないのは当然である。この場合に、ヨーロッパ特許出願第0145233号に述べられているタンパク質分解酵素及び／又は洗剤可溶化及び／又は他の工程を、この資料に述べられているように、用いることができる。

本発明の第5実施態様によると、核酸分解剤としての過酸化物の使用を提供する。本発明の第2態様の好ましい特徴には、第1態様と同様に、必要に応じて変更が加えられる。

次に、下記実施例によって、本発明を説明する。

#### 実施例 1

アルカリジェンス オイトロフスの菌株をグルコースとプロピオン酸との混合物の水性培地中でのリン制限下でのバッチ培養において増殖させて、ヒドロキシバレートのモル含量11%を含む（ポリマーの残部はヒドロキシブチレートである）ヒドロキシブチレート（HB）／3-ヒドロキシバレレート（HV）コポリマー71%を含む細胞101g/l含有培養物を得た。

PHB/Vコポリマーを含む細胞サンプルを脱イオン水中で遠心分離を用いて3回洗浄した。ボーリン（Bohlin）VOR流動計（同心円筒形型）によって測定した懸濁液粘度は580/秒として1.8mPa.sであると判明した。

pH7のSDSの2%w/v添加を用いて、細胞を溶解した。これは懸濁液の粘度を同じ装置で測定して、580/秒において90mPa.sに顕著に増加させた。充分な35%W/V H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えて、3%w/vの溶液中の濃度を得た。20℃における16時間後に、懸濁液の粘度を再び測定したところ、580/秒

において2.5 mPa・sであり、オリジナルの溶解前懸濁液の値に近いことが判明した。

#### 比較例

過酸化水素を加えなかった以外は、上記実施例の操作を繰り返した。その代わりに、SDS後に添加物を加えずに、細胞溶解物を20℃において16時間放置した。この時間の終わりの粘度は580/秒において50 mPa・sであり、これは最初の溶解後値から低下したが、実際の用途のために粘度の重大な低下ではない。

#### 実施例 2

アルカリジェンス オイトロフスのNCIMB 40214 菌株を90 cm<sup>3</sup>有効容量の発酵器中で増殖させた。培養物を下記成分（濃度 g/l、pH 7 及び 30℃）を含む培地中でインキュベートした：

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.2
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.18
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.18
グルコース	13.0
微量元素	3.0 ml
リン酸	6.5 ml (1.1 M)

培地のリン酸塩含量を制限した24時間後に、グルコース及びプロピオン酸をそれぞれ300 kg/時及び54 kg/時の速度でさらに48時間にわたって発酵器に加えた。この時間後に、細胞を回収した。

これは、ヒドロキシバレレートのもル含量9%を含む（ポリマーの残部はヒドロキシブチレートである）ヒドロキシブチレート（HB）/3-ヒドロキシバレレート（HV）コポリマー75.4%を含む細胞145 g/l含有培養物を生じた。この細胞は核酸3%を含有した。

培養物のpHを“8.80”水酸化アンモニウムによって7に調節し、SDSを3%の濃度になるように加えた。培養物の粘度の顕著な増加が生じた。過酸化水

素溶液 (35 % w / v) を 6 % w / v の濃度になるように培養物に加えた。この培養物を室温において 16 時間攪拌した。この培養物を脱イオン水によって遠心分離と再懸濁とによって 5 回洗浄した。次に、この培養物を 5 % w / v の濃度の過酸化水素によって 80 °C において 3 時間処理した。今や精製された HB / HV コポリマーを脱イオン水中で 3 回洗浄し、60 °C において 24 時間オープン乾燥させた。コポリマーの損失はセントレート (centrate) の混濁度 (turbidity) によって評価して低いと判定された。

ポリマーの黄色度指数 (YI) を ASTM 方法 D1925-70 によって測定し、30 であると判明した。

このことは約 0.4 % のタンパク質含量を実証し、物質全体は少なくとも 99 % のコポリマーであると考えられる。生成物は実質的に無臭であった。分子量は 900,000 ダルトンより大であった。それ故、これは高純度かつ高分子量の生成物であり、プラスチック材料としての使用に非常に適すると考えられる。

## ブダペスト条約に基づく菌受託証書等の写 (訳文)

エヌ・シー・アイ・エム・ビー (NCIMB)

当方参照符号 :

貴方参照符号 : PAT / 3

日付 : 1989年3月28日

ディー・バイロム博士

バイオロジカル・プロダクツ

アイ・シー・アイ・ピーエルシー

ビリンガム

クリーブランド

ティーエス23 1エルビー

拝啓

## 特許手続上の寄託に対する受託通知

微生物	菌株番号	NCIB番号
アルカリゲネス・オイトロフス ( <i>Alcaligenes eutrophus</i> )	PS-1	NCIB 40124
シュードモナス・エスピー ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	PP1	NCIB 40125
コリネバクテリウム・エスピー ( <i>Corynebacterium</i> sp.)	PP2	NCIB 40126

1989年3月24日に受け入れた上記の微生物は、特許手続上の寄託として  
1989年3月24日に受託されたことをあなたにお知らせ致します。1989

年3月20日にあなたが署名した申請書（その写しはあなたが保有しているはず  
であります）に記載された上記微生物の受託の条件にあなたは拘束されることに  
なります。

敬具

\_\_\_\_\_  
(署名)

テレンス・ダンド、理学士、哲学修士

同封物あり

私書箱31

アベイ ロード 135

アバディーン エイビー9 8ディージー

スコットランド、連合王国

電話 0224 877071

テレックス 739719MAFTRSG

ファックス 0224 874246

## 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

## 国際様式

規則7. 1の規定に基づき本頁下部に記載した国際寄託当局により交付される原寄託についての受託証

ディー・バイロム博士

バイオロジカル・プロダクツ

アイ・シー・アイ・ピーエルシー

ピリングラム

クリーブランド

ティーエス23 1エルビー

(寄託者の氏名および住所)

## I. 微生物の識別

寄託者により付与された識別のための表示: アルカリゲネス・オイトロフス

ビーエス-1

(*Alcaligenes eutrophus* P S - 1)

国際寄託当局により付与された受託番号: N C I B 4 0 1 2 4

## II. 科学的記載及び/又は分類学的名称

上記Iの微生物の識別は提案された分類学的名称によってなされた。

## III. 受領及び受託

当該国際寄託当局は上記Iにより識別された微生物を受託している。当該微生物は1989年3月24日(原寄託の日付)<sup>1</sup>に当局によって受領された。



## IV. 国際寄託当局

名称：ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・バクテリア・トリ  
ー・リサーチ・ステーション

所在地：私書箱31、アベイ ロード 135、アバディーン、 エイビー9  
8 ディージー

当該国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限のある公務員の署名：

\_\_\_\_\_  
(署名)

日付：1989年3月28日

注1：規則6.4(d)が適用される場合、かかる日付は国際寄託当局としての地位が取得された日付である。国際寄託当局としての地位の取得後にブダペスト条約の適用外でなされた寄託をブダペスト条約に基づく寄託に変更する場合は、かかる日付は当該微生物が国際寄託当局によって受領された日付である。

様式 BP/4 (単一頁)

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年9月9日

【補正内容】

(請求項2から請求項9まで及び請求項12から請求項14までを変更し、請求項15及び請求項16を削除する)

請求の範囲

1. 加工段階において問題を惹起するほど高い粘度を生じるような、充分な量の核酸を含む水性プレパレーションから生成物を回収する方法において、核酸を前記段階の前及び中に過酸化物と接触させることによる核酸分解工程を含む前記方法。

2. 固体粒子と、少なくとも0.1g/l、例えば0.5~10g/lの核酸とを含む水性プレパレーションの粘度を制御することを含む方法であって、核酸を過酸化物によって分解し、固体粒子を分離することを含む前記方法。

3. 粘度の低下後にポリヒドロキシアルカノエートをプレパレーションから分離する請求項1又は2に記載の方法。

4. プレパレーションが580/秒の剪断速度において10mPa・sより大きい、例えば50~200mPa・sの初期粘度を有する請求項1~3のいずれかに記載の方法。

5. 水性プレパレーションが細胞溶解物である請求項1~4のいずれかに記載の方法。

6. プレパレーションが細菌細胞溶解物である請求項6記載の方法。

7. プレパレーションが細胞をアニオン界面活性剤によって溶解することによって調製される請求項1~6のいずれかに記載の方法。

8. アニオン界面活性剤の濃度が0.5~10%w/vである請求項7記載の方法。

9. 細胞からポリヒドロキシアルカノエート又は多糖ポリマーを回収する方法であって、当該ポリマー以外の細胞物質の分解工程を含み、分解の第1段階において細胞物質を過酸化物によって分解する前記方法。

10. 過酸化物の濃度(過酸化水素換算して表現)が0.5~20%w/v

好ましくは0.5～10% w/vである請求項1～9のいずれかに記載の方法。

11. 15～35℃の範囲内の温度において実施される請求項1～10のいずれかに記載の方法。

12. 過酸化物が過酸化水素として供給される請求項1～11のいずれかに記載の方法。

13. pHが6～8である請求項1～12のいずれかに記載の方法。

14. ポリヒドロキシアлкаノエートポリマーがポリヒドロキシブチレート／バレレートポリマーである請求項3～13のいずれかに記載の方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB 93/02208		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 5 C12N1/08 C12P7/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,89 03226 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 20 April 1989 see page 1, paragraph 1 see page 2, paragraph 2 - paragraph 4 see page 3, paragraph 2 - page 4, paragraph 2; examples 1,3 ---	2,7,8, 14,16
X	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA vol. 166, 1968 pages 720 - 722 HUGUES SCHWEITZ 'Action de l'eau oxygénée sur la DNA en présence d'ions ferreux et de lumière' see page 720, paragraph 4 see page 721, paragraph 2 ---	2,9-11, 14,16
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 January 1994		Date of mailing of the international search report 28 -01- 1994
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Pattemaan 1 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montero Lopez, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/GB 93/02208

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 145 233 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 19 June 1985 cited in the application see page 4, line 27 - page 5, line 2 see page 5, line 7 - line 11 see page 5, line 23 - line 25 see page 9, line 22 - line 33 see page 11, line 3 - line 12; claims 1,6,11; example 20 -----	1-4, 6-10, 12-16 .

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 93/02208

Patent document cited in search report	Publication date	Parent family member(s)	Publication date
WO-A-8903226	20-04-89	DE-A- 3733921	20-04-89
		AU-B- 598945	05-07-90
		AU-A- 1988888	02-05-89
		DE-A- 3871519	02-07-92
		EP-A, B 0334904	04-10-89
		JP-T- 1503197	02-11-89
		US-A- 5118603	02-06-92
EP-A-0145233	19-06-85	DE-A- 3472271	28-07-88
		JP-B- 4061638	01-10-92
		JP-A- 60145097	31-07-85
		US-A- 4910145	20-03-90

---

フロントページの続き(51)Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I

C 1 2 R 1:05)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG  
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY,  
CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, H  
U, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG  
, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO,  
RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, VN